



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO
AGENTES TERAGNÓSTICOS PARA LA
ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

Autor: Sandra Junquera Navarrete

Tutor: María Pilar López-Alvarado Gutiérrez

Convocatoria: Junio 2017

INDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	3
OBJETIVOS	5
METODOLOGIA	6
RESULTADOS Y DISCUSION	6
1. Definición de agente teragnóstico	6
2. Características principales de los agentes teragnósticos para la Enfermedad de Alzheimer.....	7
3. Diseño de agentes teragnósticos.....	11
4. Agentes teragnósticos para la Enfermedad de Alzheimer que han demostrado eficacia in vitro.....	12
4.1 Base heterocíclica de Schiff con estructura de benzotiazol: CBMDP.	12
4.2 Análogos de curcumina: CRANAD-28 y CRANAD-44.	13
4.3 Estructuras derivadas de carbazol: DBA-SLOH.	15
4.4 Derivados de estililquinolinas: (E)-6-metil-4-amino-2-estirilquinolina.	16
5. El futuro de los agentes teragnósticos.	18
CONCLUSIONES	18
BIBLIOGRAFÍA	19

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es altamente prevalente entre las personas de mayor edad de las sociedades de hoy en día. Por ello, es necesario encontrar solución para frenar esta enfermedad irreversible, en los primeros estadios, antes de la aparición de los síntomas clínicos.

Los agentes teragnósticos constituyen una gran herramienta para conseguir diagnosticar y tratar, a la vez y de forma precoz, la EA. Basándose en la teoría que considera a las placas amiloides como principal biomarcador de esta enfermedad, se han desarrollado múltiples moléculas candidatas a agente teragnóstico. En concreto, los ejemplos presentes en este trabajo: un derivado aminado de estililquinolina, estructuras derivadas de carbazol (DBA-SLOH) y un análogo de curcumina (CRANAD-28), han obtenido resultados muy satisfactorios en los ensayos *in vitro* que indican que podrían ser llevados a la práctica clínica habitual en un futuro. Estas moléculas combinan el diagnóstico mediante espectroscopia de fluorescencia, ya que se comportan como sondas en el infrarrojo cercano (NIR) cuando se unen a los agregados β A. Con el tratamiento mediante inhibición de la formación de los oligómeros tóxicos de proteína amiloide en el tejido cerebral, ya que son capaces de quelar los metales necesarios para iniciar el proceso de agregación proteica.

Palabras clave: Alzheimer, agente teragnóstico, sonda NIR, espectroscopia de fluorescencia, inhibición agregación placas amiloides, quelar metales.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La enfermedad de Alzheimer, es la causa más común de demencia entre las personas mayores a día de hoy. Se calcula que afecta a 47,6 millones de personas en todo el mundo. Teniendo en cuenta el progresivo envejecimiento de la población mundial y el aumento creciente de la esperanza de vida media, cada año se registran 7,7 millones de nuevos casos de EA¹. España cumpliría con la estadística mundial, según indican los datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística (INE)². Esto supone un alto impacto de carácter físico, psicológico, social y económico, tanto para los cuidadores y familiares, como la sociedad en general³.

Esta enfermedad es un proceso neurodegenerativo del sistema nervioso central (SNC), que se manifiesta clínicamente con el deterioro de la función cognitiva. Existen múltiples teorías que intentan explicar esta enfermedad desde un punto de vista molecular. La hipótesis más aceptada dentro de la comunidad científica dice que se debe

a la acumulación de proteínas mal plegadas que desencadenarían la degeneración del tejido cerebral. En concreto, existen dos tipos de estructuras patológicas-tóxicas a las que se les atribuye la responsabilidad de esta enfermedad, que se pueden observar en el análisis post-mortem del cerebro de los enfermos, y que se forman antes de la aparición de los síntomas clínicos:

- **Ovillos neurofibrilares:** depósitos *intracelulares* de agregados insolubles de la *proteína tau* asociada a los microtúbulos, en su forma hiperfosforilada.
- **Placas seniles o placas amiloides:** depósitos *extracelulares* de agregados insolubles de *péptidos β -amiloides* (β A). Serán las formas oligoméricas de éstas, las que presenten carácter neurotóxico⁴.

Este trabajo se centra en la acumulación de placas β A como uno de los principales biomarcadores de EA; entendiendo como **biomarcador**, aquella sustancia o biomolécula que se puede medir y evaluar como un indicador de procesos normales o patológicos. Suelen utilizarse para diagnosticar una enfermedad, para establecer su gravedad, así como para seguir su evolución o bien para vigilar la respuesta al tratamiento⁵.

Asumiendo la veracidad de la teoría amiloidogénica sobre el origen de EA, que señala la formación de los agregados de proteínas amiloides, como el principal mecanismo fisiopatológico de la enfermedad, los científicos centran sus esfuerzos en el desarrollo de sondas de emisión en el infrarrojo cercano (NIR) para el diagnóstico por imagen de las especies β A, mediante técnicas espectroscópicas de fluorescencia. Entendiendo por **sonda**, cualquier compuesto capaz de unirse con afinidad y especificidad a una diana biológica o biomarcador bioquímico y, capaz de ser detectado externamente mediante una técnica de imagen. Hasta ahora las dos técnicas de diagnóstico por imagen más usadas son Tomografía de Emisión de Positrones (PET), en la que se utilizan isótopos radioactivos y la Resonancia Magnética de Imagen (MRI), en la que se somete al paciente a un intenso campo magnético. Es necesario subrayar la importancia del diagnóstico por imagen *in vivo* de los depósitos de los péptidos β A, porque como ya se ha mencionado anteriormente, la formación de estos agregados es previa a la aparición de cualquier síntoma clínico, lo que conduce a un diagnóstico precoz de la enfermedad. Con el empleo de la espectroscopia de fluorescencia conseguimos aumentar la sensibilidad y especificidad. Además, es una técnica no invasiva para el paciente, en la que no está implicado el empleo de material radioactivo y con la que se puede monitorizar la agregación de β A a tiempo real⁶.

Numerosos artículos señalan el éxito en la búsqueda de este tipo de moléculas diagnósticas. De hecho, existen ya varios colorantes fluorescentes con afinidad por las placas β A como son el Rojo Congo y la Tioflavina T (Fig. 1) que se utilizan en el diagnóstico post-mortem de la enfermedad, pero que debido a su alta toxicidad, imposibilidad de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y que la emisión de fluorescencia es a una longitud de onda menor de 500 nm, lo que implica que esta señal puede verse interferida por moléculas biológicas con fluorescencia nativa, no es posible aplicarlos al diagnóstico en tejidos vivos. Se consideran moléculas de referencia para el estudio de nuevas sondas diagnósticas.

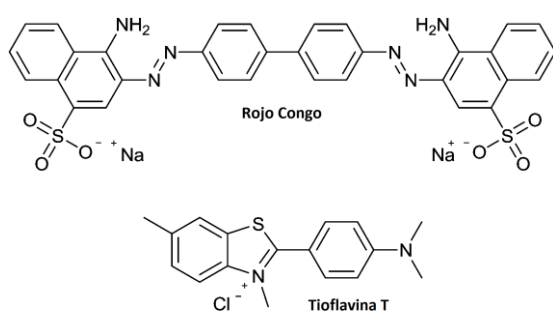


Fig 1. Estructura química de los compuestos Rojo Congo y Tioflavina T utilizados como colorantes fluorescentes post-mortem.

La investigación también está orientada a la búsqueda de fármacos inhibidores de la agregación proteica que prevengan la formación de las estructuras oligoméricas de β A como terapia, ya que, por desgracia, la batería de medicamentos disponible para esta enfermedad es todavía paliativa más que curativa.

Como veremos a continuación, la industria farmacéutica se ha replanteado como mejorar el acercamiento a esta patología. Una de las soluciones es tratar el Alzheimer en sus primeros estadios, es decir, realizar una intervención temprana de la enfermedad, porque cuando aparecen los síntomas, el daño es irreversible. Teniendo esta idea en mente, se apuesta por un nuevo tipo de molécula que combine las últimas novedades en cuanto a diagnóstico y tratamiento de EA. En otras palabras, se apuesta por **agentes teragnósticos**.

OBJETIVOS

- Definir qué es un agente teragnóstico.
- Conocer qué características tiene que tener una molécula para que sea considerado un agente teragnóstico para la EA.
- Conocer métodos de diseño para la obtención de moléculas teragnósticas.

- Entender en que principios de diagnóstico y tratamiento se basan los agentes teragnósticos para la EA.
- Enumerar ejemplos de moléculas que han demostrado eficacia *in vitro* como agentes teragnóstico de la EA.
- Conocer que se espera en un futuro de los agentes teragnósticos de EA.

METODOLOGIA

Este trabajo consiste en una revisión bibliográfica, utilizando diferentes bases de datos tales como PubMed, Scifinder Scholar y Science Of Synthesis, donde se pueden encontrar artículos y revistas científicas, ordenados según su fecha de publicación, de más reciente a más antiguo, con información sobre el avance en el estudio de diferentes moléculas, que tienen propiedades que les convierten en potenciales agentes teragnósticos para la Enfermedad de Alzheimer, además de otro tipo de información de índole científica de interés.

Para ello, realizamos barridos de búsqueda en cada una de esas fuentes de información, utilizando términos como “Theragnostic agents Alzheimer”, “Multifunctional fluorophores Alzheimer”, “Bifunctional compounds Alzheimer”, “Multifunctional compounds Alzheimer” como filtro, para poder ser redirigidos a aquellos artículos que contienen la información de interés para el desarrollo de este artículo.

También se ha hecho uso del programa informático ChemSketch, que ha permitido dibujar todas las estructuras orgánicas presentes en este trabajo.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Definición de agente teragnóstico.

El término de Teragnóstico fue acuñado en 1998 por John Funkhouser, para describir un material que permite la combinación de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la eficacia del tratamiento. Aunque la definición exacta de este neologismo está todavía en evolución, hay que tener claro que este concepto está relacionado con el diagnóstico y la terapia, pero difiere totalmente de los métodos tradicionales ya que se trabaja con un agente adecuadamente diseñado para integrar el diagnóstico y el tratamiento en una misma estructura.

El campo del teragnóstico ha sido explorado ampliamente para su aplicación al cáncer, pero hasta la fecha, no se había pensado en recurrir a este método para otro tipo de patologías.

En la bibliografía se pueden encontrar dos clases de moléculas teragnósticas: nanosensores y compuestos orgánicos (sondas fluorescentes). Cuando se trata de enfermedades oncológicas, se recurre a la nanomedicina. Los nanosensores, son muy versátiles y permiten un diagnóstico ultra sensible y una terapia combinada incorporada en un único sistema de forma integrada. En el caso de una enfermedad del SNC, como es el Alzheimer, la BHE podría suponer un impedimento para el acceso de los nanodispositivos y, por consiguiente, el acceso de la medicación en el lugar adecuado. Además, su invasividad, hace que no sea compatible para tratamiento crónico. Por tanto, el teragnóstico para la EA, estará basado en el uso de pequeñas moléculas orgánicas fluorescentes⁷.

2. Características principales de los agentes teragnósticos para la Enfermedad de Alzheimer.

Todos los agentes teragnósticos estudiados para la EA que serán descritos en este trabajo, tienen en común su modo de actuación: El diagnóstico se debe a la detección por imagen de la emisión de fluorescencia en la zona NIR cuando la sonda se une a las placas β A, mientras que el tratamiento, se consigue por la inhibición de la agregación de los monómeros proteicos amiloides evitando la formación de los oligómeros tóxicos.

Antes de enumerar las características ideales que debe presentar una molécula candidata a ser agente teragnóstico en EA, se va a hacer una breve introducción sobre los principios diagnósticos y teragnósticos en los que se basan estas moléculas.

Diagnóstico: Espectroscopia de fluorescencia con una sonda NIR.

Como ya hemos avanzado previamente, la espectroscopia de fluorescencia es una alternativa muy prometedora, a día de hoy, para el diagnóstico por imagen de los agregados amiloides. De ahí, que haya aumentado la demanda de nuevas entidades químicas que puedan ser usadas como sondas fluorescentes NIR para la detección de estas placas.

El fenómeno de fluorescencia se produce cuando una molécula recibe una cantidad de energía determinada con capacidad para promocionar los electrones desde estados moleculares de baja energía a otros de mayor energía, ocupando orbitales vacíos y dando

lugar a una transición que corresponde a una banda de absorción en el espectro. En los compuestos fluorescentes, los electrones regresan del estado excitado al estado fundamental por emisión de fotones (fluorescencia) dando lugar a una banda de emisión en el espectro (Fig. 2). Esta técnica de diagnóstico por imagen se basa en la detección de esa banda de emisión de fluorescencia por parte de la sonda, en la región NIR localizada desde los 650nm hasta los 900nm del espectro. Es importante remarcar que la radiación excitadora de la sonda NIR, debe ser capaz de atravesar los tejidos hasta el cerebro, y la emisión fluorescente generada de vuelta, deberá ser capaz también de salir del tejido para poder ser detectada.

Lo fundamental para conseguir la emisión en ese rango de longitud de onda, es disponer de compuestos fluorescentes, cuya diferencia de energía entre los orbitales HOMO (orbital molecular más alto ocupado) y LUMO (orbital molecular más bajo desocupado) sea la menor posible. Existen diferentes factores que influyen en la reducción del intervalo HOMO-LUMO y que hay que tener en cuenta al estudiar una posible molécula diagnóstica NIR: los sistemas conjugados extendidos, la introducción de grupos aceptores y donadores en la misma molécula, la longitud de enlace y el grado de planaridad.

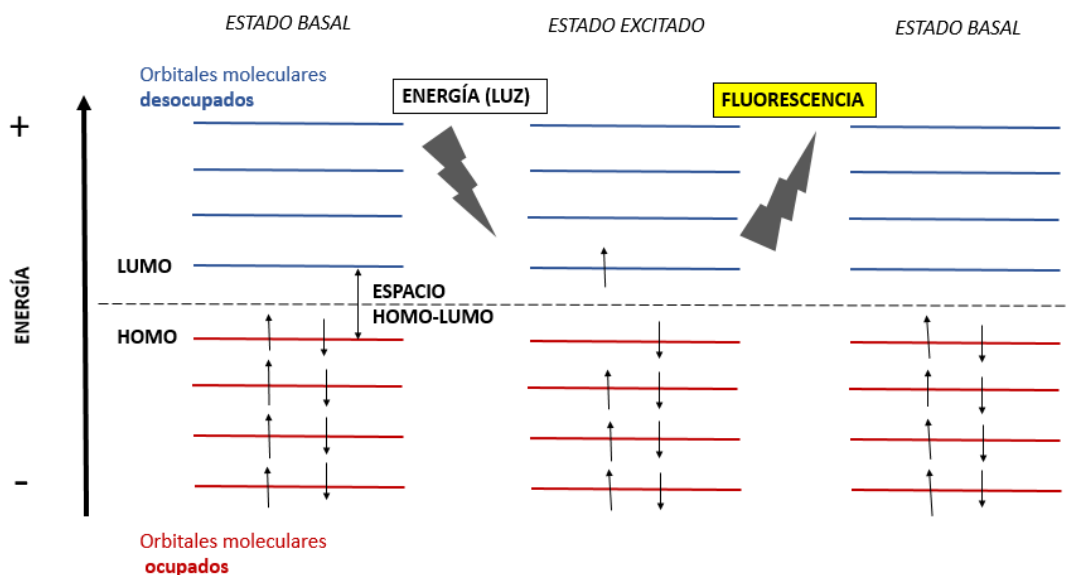


Fig 2. Representación del fenómeno de fluorescencia.

La técnica más utilizada para diseñar sondas NIR, es añadir estructuras “push-pull”, es decir, tiene que haber un grupo donador de electrones y un grupo aceptor de electrones, conectados a través de un sistema π -conjugados altamente polarizable. El grupo donador

debe poseer un par de electrones sin compartir en un orbital p capaz de interaccionar con los orbitales π del sistema conjugado incrementando así la energía de los orbitales HOMO. A su vez los orbitales LUMO son más estables por la interacción de los orbitales antienlazantes del grupo aceptor, disminuyendo el intervalo HOMO-LUMO. Esto traducido a términos de energía significa que el aumento de la deslocalización electrónica provocado por este sistema induce la disminución del espacio HOMO-LUMO. Al disminuir la energía, aumenta la longitud de onda^{6, 8, 9, 10}.

Tratamiento: Inhibición de la agregación de las placas amiloides.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la teoría amiloidogénica sobre el origen de EA, dice que el mal plegamiento de las proteínas amiloides, provoca su precipitación en el tejido cerebral, formando agregados conocidos como placas amiloides, responsables últimas de la toxicidad cerebral.

La industria farmacéutica se está volcando en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de EA, que puedan bloquear la formación de estos oligómeros tóxicos, (o al menos ralentizarla). Así, se frenaría el avance de esta enfermedad a estadios más graves. Pero en ningún caso, se conseguiría revertir la formación de las estructuras ya depositadas en el tejido cerebral.

Los estudios *in vitro* sobre la agregación de proteínas amiloides, demuestran que los péptidos β A poseen sitios de unión para los iones metálicos Fe^{3+} y Cu^{2+} . Como consecuencia de que, durante la EA, la homeostasis de metales se ve alterada, los iones metálicos tienden a acumularse. Estos iones metálicos “extras”, se coordinan en sus sitios de unión, con unos aminoácidos determinados, de la secuencia proteica amiloide (concretamente histidina, tirosina y aspartato) facilitando el proceso de agregación y por tanto la formación de estas estructuras patológicas (Fig. 3).

Si se utilizan fármacos capaces de atravesar la BHE y quelar de forma selectiva estos iones, ya no estarían disponibles para la agregación. Se está evitando así, la formación de los oligómeros β A tóxicos.

La acumulación de iones metálicos no solo interviene en la agregación de las proteínas amiloides, también desencadenan procesos de estrés oxidativo que resultan en la muerte de células neuronales, lo que lleva a la disfunción sináptica. La utilización de fármacos quelantes de iones metálicos, también frenaría la evolución de la enfermedad por esa vía^{11, 12, 13}.

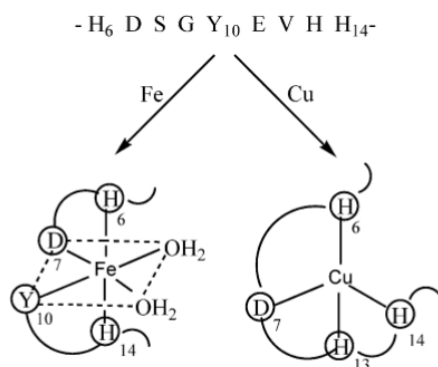


Fig 3. Esquema representativo de los sitios de unión para hierro (III) y cobre (II) con las proteínas β A.

Por tanto, las **características** que dotan a las moléculas de **capacidad teragnóstica** son⁸:

- *Alta afinidad por las placas amiloides.* Hay que asegurarse que la sonda se une a estas estructuras patológicas y nada más que a estas estructuras, para evitar la posibilidad de resultados falsos positivos.
- *Capacidad para poder cambiar la intensidad de la fluorescencia emitida cuando se une a las fibrillas β A.* Al unirse a dichos agregados, la molécula será más rígida y no tendrá libertad conformacional, convirtiéndose así en una molécula plana y mostrando cambios en su máximo de emisión.
- *Capacidad de absorber y emitir energía en la región NIR (650nm-900nm).* A menor longitud de onda, la energía es más penetrante pero también hay más interferencias en la emisión de luz debido a los tejidos y moléculas biológicas fisiológicas. Por eso se ha seleccionado ese rango como óptimo.
- *Amplio desplazamiento de Stokes.* Debido a la existencia de procesos no radiativos, no toda la radiación absorbida es emitida. La diferencia de energía que existe entre las absorciones y emisiones se conoce como desplazamiento de Stokes.
- *Capacidad para bloquear la agregación de las proteínas,* pudiendo inhibir de esta manera la formación de nuevas placas seniles.
- *Naturaleza débil de la unión con la albúmina sérica humana.*
- *Tamaño molecular pequeño y liposolubilidad adecuada* para poder atravesar la BHE de forma óptima, alcanzando así el lugar de acción.
- *Baja toxicidad celular.*

3. Diseño de agentes teragnósticos.

Las dos estrategias principales para el diseño de agentes teragnósticos de EA son el método de la **conexión** y el método de la **superposición** (Fig. 4).

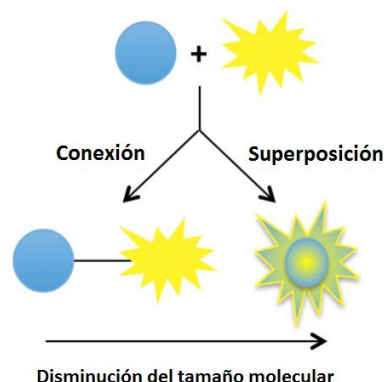
El primer método se basa en *la unión de los elementos estructurales de los agentes utilizados en el diagnóstico y la terapéutica*. Se crea así un nuevo conjugado molecular de dos partes, una que lleva las propiedades diagnósticas y otra que lleva las propiedades terapéuticas, conectadas por un espacio de diferente naturaleza y longitud.

El segundo método está indicado siempre y cuando se cumpla con un requisito y es que *la sonda diagnóstica y el fármaco tengan una estructura básica común*, para que puedan superponerse e *integrarse muy bien en una única entidad química*. Esto solo tiene sentido teniendo en cuenta que tienen un mismo objetivo: las placas amiloides.

El peso molecular de estas nuevas moléculas de diseño, tiene que ser tenido muy en cuenta, ya que como hemos dicho antes, los agentes teragnósticos tiene que atravesar la BHE para poder acceder a las placas β A. Los ligandos diseñados según el método de la conexión tienen más probabilidad de tener un alto peso molecular y por tanto, son menos favorables para atravesar la BHE, mientras que los diseñados por el método de la superposición, es más probable que tengan un peso molecular más bajo y, por tanto, mejores propiedades como agente teragnóstico.

La solubilidad en agua del compuesto, también es un factor a tener en cuenta. *A priori*, los problemas asociados con una alta hidrofobicidad del conjugado pueden ser superados usando sustituyentes hidrofílicos con polietilenglicol (PEG) o sintetizando las sales de amonio de los compuestos de interés.

Fig 4. Representación esquemática de los dos principales métodos de síntesis de agentes teragnósticos.



Por tanto, para el diseño de agentes teragnósticos que puedan marcar e inhibir simultáneamente la agregación patológica de las fibrillas β A, es preferible recurrir al método de la superposición, solapando aquellas propiedades moleculares que reconocen y consecuentemente inhiben las proteínas amiloides y aquellas responsables del diagnóstico mediante fluorescencia⁷.

4. Agentes teragnósticos para la Enfermedad de Alzheimer que han demostrado eficacia *in vitro*.

Hasta la fecha, la batería de moléculas que puedan ser consideradas como posibles agentes teragnósticos para EA es reducida. La investigación para el diseño de las mismas supone un desafío y se encuentra en los primeros estadios. Algunos ejemplos presentes en la bibliografía son:

4.1 Base heterocíclica de Schiff con estructura de benzotiazol: CBMDP.

M. Jadhao et al.¹⁴ han desarrollado un posible agente teragnóstico combinando dos compuestos que ya se conocen como moléculas diagnósticas y terapéuticas efectivas. Para la actividad diagnóstica, se toma la estructura benzotiazólica del colorante ThT para marcar las placas amiloides. Para el tratamiento, se toma la estructura quelante de iones del compuesto clioquinol (CQ). Se crea así un nuevo compuesto conocido como CBMDP (compuesto **1**) (Fig. 5), con nuevas características, que teóricamente, superaría las limitaciones de los compuestos de partida.

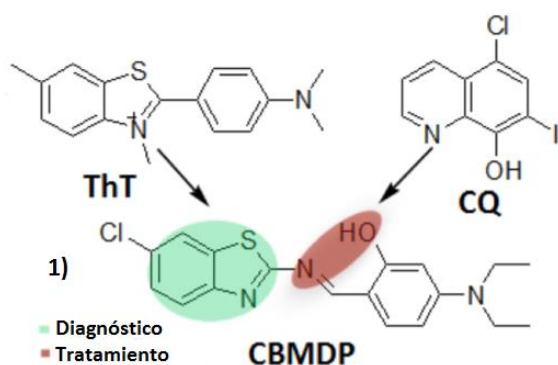


Fig 5. Estructura química del compuesto candidato a agente teragnóstico.

El núcleo de benzotiazol tiene especial afinidad hacia las placas amiloides por lo que es capaz de reconocerlas y de unirse a ellas de forma significativa. Se sitúa en una zona conocida como el bolsillo amiloide, que incluye la región amiloidogénica y el sitio de unión a metales. Ambas regiones juegan un papel crucial en la agregación proteica.

El tratamiento con el compuesto **1** se debe a que puede inhibir la formación de los agregados amiloides. Debido a la proximidad del lugar donde interacciona la molécula con los agregados, esta es capaz de coordinarse con los iones metálicos que inducen el proceso de entrecruzamiento de las proteínas, en concreto Cu^{2+} . Además, este compuesto parece que estabiliza los monómeros βA en su forma inicial, lo que retrasa el proceso de agregación.

Por su liposolubilidad, se predice teóricamente que la molécula es capaz de atravesar la BHE de forma eficiente para llegar al lugar de acción, pero no se llegó a comprobar esta característica en el laboratorio.

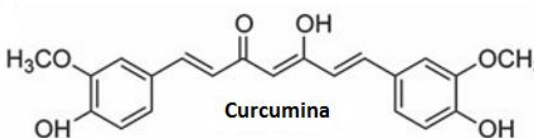
Como inconvenientes de uso de esta molécula, que no emite fluorescencia en la región NIR. El pico máximo de emisión se presenta a las 448nm, zona ultravioleta visible (UV-vis).

Además, cuando se incubaba CBMDP con proteínas β A, se observa un marcado incremento en la intensidad de la fluorescencia, lo que nos indicaría que la molécula ha llegado a su destino. Sin embargo, si lo incubamos con una mezcla de monómeros y oligómeros, este candidato tiene limitaciones para distinguir entre un tipo de estructura y otro.

Por tanto, el compuesto **1**, no presenta buenas características para seguir avanzando en su estudio como posible agente teragnóstico.

4.2 Análogos de curcumina: CRANAD-28 y CRANAD-44.

La curcumina es un pigmento amarillo de origen natural, cuya fluorescencia intrínseca podría aprovecharse para el diagnóstico por imagen de las placas β A. Sin embargo, en la práctica clínica se ha comprobado que no funcionaría como un buen agente diagnóstico, ya que la emisión de fluorescencia se produce en una longitud de onda fuera del rango NIR óptimo.¹⁵



X. Zhang et al.¹⁶ han diseñado, sintetizado y puesto a prueba dos análogos de curcumina que superan esa limitación. Se consiguió aumentar el máximo de emisión añadiendo un anillo de boronato, ya que esto permite la transición del par de electrones desapareados del oxígeno central al orbital vacío del boro, con lo que se consigue estrechar el intervalo HOMO-LUMO provocando el desplazamiento de la emisión de fluorescencia a una longitud de onda dentro de la zona NIR.

Análogo 1: CRANAD-44 (compuesto **2**) (Fig.6). La posición N-1 de los pirazoles, está sin sustituir, lo que le permite formar un mayor número de tautómeros. A mayor número de tautómeros, mayor es la emisión de energía en forma no radiativa. Este es uno de los motivos por el cual el compuesto **2** fue descartado como posible agente teragnóstico. Además, se vio que no es capaz de unirse a las placas amiloides, por eso no tiene sentido continuar con el estudio de esta molécula.

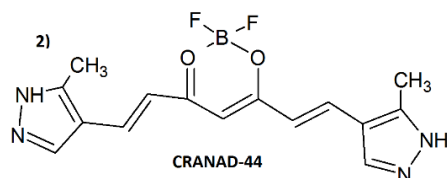


Fig 6. Estructura química del compuesto candidato a agente teragnóstico.

Análogo 2: CRANAD-28 (compuesto **3**) (Fig.7). Este derivado está sustituido con un grupo fenilo en la posición N-1 de cada pirazol, por tanto forma un menor número de tautómeros y por consiguiente una menor pérdida de energía en forma no radiativa.

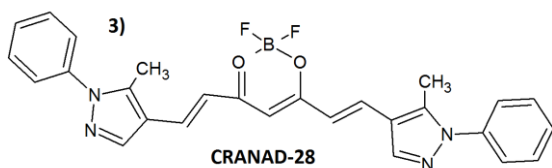


Fig 7. Estructura química del compuesto candidato a agente teragnóstico.

Al investigar las propiedades fluorescentes de la molécula, se observó el pico máximo de emisión dentro de la zona NIR (578nm).

Para comprobar la afinidad por las placas amiloides, se incubó el compuesto **3** junto con proteínas βA en forma de monómeros, dímeros y oligómeros solubles y también con los agregados insolubles. La intensidad de fluorescencia disminuye tras la incubación, lo que nos indica que efectivamente interacciona con estas estructuras. La razón por la cual la intensidad de fluorescencia disminuye, y no aumenta, como ocurre con todas las sondas NIR presentes en la bibliografía hasta la fecha, es desconocida.

Analizando las constantes de disociación (K_d) del compuesto **3** con todas las formas de proteínas amiloides estudiadas, se observa que la K_d de valor menor corresponde a la unión del compuesto con la forma agregada insoluble. Un valor de K_d bajo, indica que la unión de las estructuras implicadas es de alta afinidad.

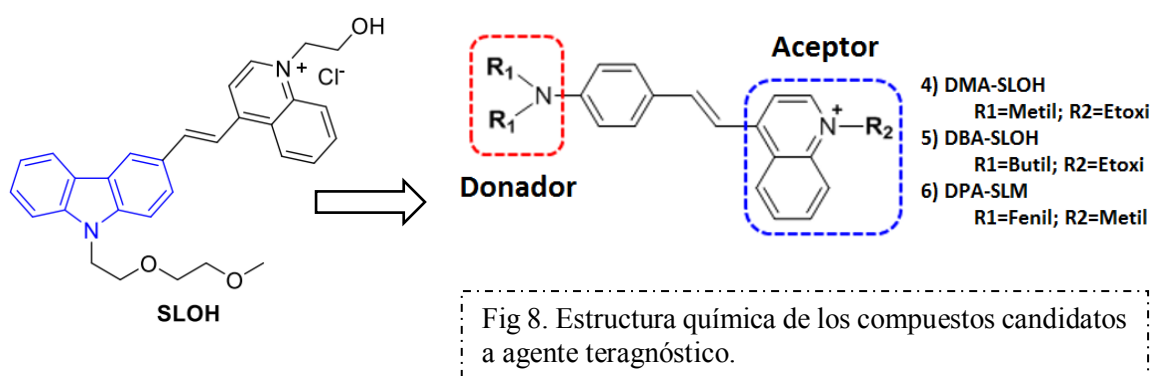
El desplazamiento de Stokes del compuesto **3** es considerablemente amplio (80nm).

Con relación a la actividad terapéutica, los grupos pirazol parece ser que pueden interferir con la coordinación del Cu^{2+} , lo que atenuaría la formación de las placas βA . Se recurrió a la técnica de Western Blot (sistema rápido y muy sensible para la detección y caracterización de proteínas que se basa en la especificidad de reconocimiento entre antígeno y anticuerpo) para cuantificar el número de monómeros βA remanentes tras la incubación del compuesto **3** con proteínas amiloides. Efectivamente, la cantidad de monómeros libres de entrecruzamiento, es significativamente alta.

Para asegurar que pueda ser utilizado *in vivo*, se examinó la permeabilidad a través de la BHE. Tras 5 minutos, el compuesto logra llegar al lugar de acción.

4.3 Estructuras derivadas de carbazol: DBA-SLOH.

Y. Li et al.¹⁷ han realizado una búsqueda de nuevas moléculas que puedan ser usadas como teragnóstico en la EA. Toman como base un derivado de fluoróforos de cianina con estructura de carbazol que ya ha demostrado previamente su actividad teragnóstica (SLOH). Las 3 posibles moléculas son derivados catiónicos conocidos, como DMA-SLOH (**4**), DBA-SLOH (**5**) y DPA-SLM (**6**) (Fig. 8).



El diseño de estas moléculas cargadas está basado en la estructura donador- π -aceptor: el grupo donador está conjugado con el nitrógeno aceptor de la quinolina a través del sistema π conjugado.

El resultado de este estudio muestra que, entre todos ellos, el compuesto número **5** (DBA-SLOH), tiene el mejor potencial como agente teragnóstico *in vivo* ya que reúne las mejores características para ser un agente teragnóstico en EA *in vitro*:

Jugando con los sustituyentes R_1 y R_2 , se puede regular la liposolubilidad de los compuestos y por tanto mejorar la permeabilidad a través de la BHE. A mayor longitud de los sustituyentes alquílicos, mayor liposolubilidad y por tanto mejor accederá al lugar de acción. El compuesto **5**, con una longitud de cadenas alquílicas moderada, presenta buena liposolubilidad y una excelente permeabilidad a la BHE.

En cuanto a las propiedades fluorescentes, presentan el pico máximo de emisión entre los 650-700nm, indicando que es compatible su utilización como sonda diagnóstica por imagen en la zona NIR del espectro.

Además, cumple la característica de tener un amplio desplazamiento de Stokes (mayor de 100nm).

La fluorescencia aumenta de forma significativa cuando se une a los agregados βA . Podríamos decir que estos compuestos se “encienden” cuando interaccionan con esta estructura fisiopatológica. Además, el comportamiento fluorescente de la molécula es

diferente frente a los monómeros que a las fibrillas: la respuesta es entre 2 y 5 veces más intensa cuando se une a las fibrillas.

Comparando las constantes de disociación de estos compuestos con las fibrillas y con los monómeros, se puede afirmar que la afinidad de la unión por las fibrillas es significativamente más fuerte que por las formas monoméricas. En especial para el compuesto **5**, ya que parece ser que la longitud de las cadenas alquílicas puede ser crucial también para la unión con estas estructuras patológicas.

Además, el compuesto **5** presenta una fuerza de unión muy débil con la albúmina sérica bovina.

Para explorar el potencial terapéutico de estas nuevas moléculas, se estudió el efecto inhibitorio sobre las especies βA . Se puso en contacto los posibles agentes teragnósticos con los péptidos amiloides. Después se revelaron los resultados marcando los agregados con ThT y efectivamente, se observó que consiguen disminuir la tasa de agregación de las proteínas amiloides.

Por último, para valorar el potencial clínico de la aplicación del compuesto **5**, se evaluó la citotoxicidad de estos colorantes frente a células humanas del neuroblastoma SH-SY5Y. El resultado muestra que no existe efecto citotóxico apreciable.

Los autores no solo realizaron ensayos *in vitro*. También utilizaron ratones Tg para probar la capacidad del compuesto **5** como detector de las especies βA *in vivo* con resultado positivo.

4.4 Derivados de estililquinolinas: (*E*)-6-metil-4-amino-2-estirilquinolina.

M. Staderini et al,¹⁸ del grupo del prof Menéndez, han realizado un estudio comparativo de tres tipos de estructuras derivadas de estililquinolinas (compuestos **7**, **8** y **9**) que pueden ser consideradas, a priori, como agentes teragnósticos (Fig. 9).

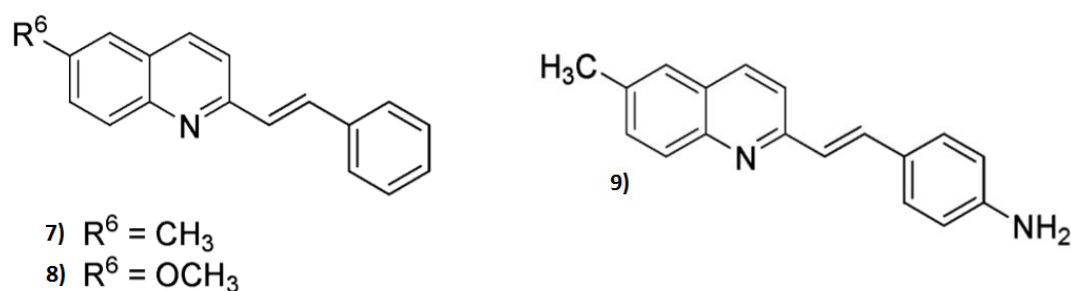


Fig 9. Estructura química de los compuestos candidatos a agente teragnóstico.

En concreto, el radical estirilo parece ser la parte clave, que debe estar presente siempre, ya que explica este comportamiento bifuncional.

El resultado de esta investigación muestra que el derivado número **9** ((*E*)-6-metil-4-amino-2-estirilquinolina), tiene el mejor potencial como agente teragnóstico *in vivo* ya que reúne las mejores características para ser un agente teragnóstico en EA *in vitro*:

El estudio de la fluorescencia de estos tres derivados, en una variedad de ambientes, polares y no polares, revela que el compuesto **9**, debido a la introducción del grupo amino en posición 4, crea un fenómeno de conjugación con el nitrógeno de la quinolina, lo que desplaza el fenómeno de emisión de fluorescencia hacia la región espectral NIR. Es más, como clorhidrato y en estado sólido, muestra un máximo de emisión por encima de los 600nm.

Otra de las ventajas del compuesto **9** frente a los otros derivados es que presenta un amplio desplazamiento de Stokes (mayor de 150nm).

Otra característica que cumplen es que las propiedades fluorescentes cambian, cuando se unen a los agregados β A, lo que nos permite identificar que se ha unido a la diana.

Para corroborar que podrían atravesar la BHE, se realiza el test de PAMPA (corresponde a las siglas en inglés de Ensayo de Permeabilidad de Membrana Paralelo Artificial) con resultado especialmente óptimo para el compuesto **9**.

La afinidad de estos derivados por las placas seniles se puso a prueba mediante la realización de un experimento utilizando concentraciones fijas de β A y Tioflavina T (ThT) y una concentración creciente del compuesto **9**. El resultado muestra que efectivamente se une a estos agregados con gran afinidad y, es más, sugiere que podría tener dos lugares de acción, uno principal y otro lugar secundario, compartido con la ThT.

Respecto a la potencia inhibitoria de la agregación de las proteínas β A de estas estructuras, los derivados **7** y **8** no inhiben la formación de las placas amiloides de forma significativa, en cambio el compuesto **9**, sí es capaz de inhibir la agregación.

También se ha comprobado que interacciona de forma débil con la albúmina sérica humana.

Por último, el estudio de la toxicidad muestra que el compuesto es poco tóxico, ya que permanecen viables más del 90% de las células con las que estuvo en contacto durante el experimento.

5. El futuro de los agentes teragnósticos.

El objetivo último e ideal que se pretende conseguir con el desarrollo de agentes teragnósticos es proporcionar una medicina personalizada para cada paciente. Este tipo de molécula bifuncional, es una herramienta fundamental, ya que la fusión del diagnóstico y el tratamiento permite optimizar la eficacia del tratamiento, además de ofrecer un mejor pronóstico a cada individuo.

No sería de extrañar que, en un futuro, los agentes teragnósticos para proteínas βA , fuesen desbancados por otras moléculas con el mismo fin, pero cuya estructura diana fuesen los ovillos neurofibrilares de proteína tau hiperfosforilada, ya que existen estudios que señalan que la severidad de la EA se correlaciona mejor con la cantidad de fibrillas de proteínas tau. Sin embargo, este tipo de sonda está emergiendo de forma más lenta que las sondas para las placas amiloides.

La teragnosis podría ser la clave para la mejoría de la calidad de vida y bienestar de la sociedad. El gran paso será lograr trasladar todos los resultados válidos que se están obteniendo *in vitro*, a la práctica clínica habitual en pacientes reales.

CONCLUSIONES

Es fundamental para la Enfermedad de Alzheimer, ser diagnosticada antes de la aparición de los síntomas clínicos: cuanto más precoz sea la detección de la enfermedad, mayor probabilidad de supervivencia del paciente. Esto es una ardua tarea, ya que la EA es una enfermedad multifactorial, cuyo mecanismo etiopatogénico no está claro todavía. A pesar de ello, los científicos confían en que se pueda conseguir, si se recurre al teragnóstico, es decir, a la combinación de diagnóstico y tratamiento en una misma molécula. En concreto, diagnóstico por imagen utilizando espectroscopia de fluorescencia en la región NIR (técnica sensible, específica y no invasiva) y tratamiento debido a que las moléculas son capaces de quelar los iones metálicos que desencadenan los entrecruzamientos causantes de la agregación y depósito de nuevas estructuras amiloides tóxicas en el cerebro.

A día de hoy, estas moléculas han sido probadas únicamente a nivel de laboratorio (*in vitro* y ensayos con ratones) pero los resultados que se han obtenido son realmente esperanzadores.

Moléculas como las expuestas en este trabajo podrían ser buenos agentes teragnósticos en un futuro. Especialmente, el derivado aminado de la estililquinolina y el derivado de carbazol, parecen ser los candidatos que más probabilidad tienen de ser

utilizados en la práctica clínica. Estos dos compuestos cumplen con todas las características necesarias que les hacen moléculas aptas para ser agentes teragnóstico: son compuestos fluorescentes en la región NIR, con alta afinidad para marcar las placas amiloides, capacidad para inhibir la agregación de las proteínas β A, con el tamaño adecuado para que puedan atravesar la BHE y por tanto tener acceso a la diana diagnóstica y terapéutica, sin interferencias con otros compuestos biológicos y sin ser compuestos tóxicos para las demás células del organismo.

El impacto clínico del teragnóstico en el Alzheimer está lejos de obtener resultados claros, sin embargo, sí hay señales iniciales de éxito. Ningún agente ha sido probado en humanos todavía porque se necesitarán los avances tecnológicos de los próximos años, para poder convertir esta potencialidad en realidad y que los pacientes pudieran disfrutar de los beneficios que supondrían.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Asociación Española de científicos: Enfermedad de Alzheimer: Bases moleculares y aproximaciones terapéuticas [Internet]. Madrid: Instituto de Química Médica (CSIC). [Actualizado en abril 2107, consultado en mayo 2017]. Disponible en: <http://www.aecientificos.es/empresas/aecientificos/intereshtml/alzheimer/alzheimer.htm>
- 2) INE: Instituto Nacional de Estadística [Internet]. España. Disponible en: <http://www.ine.es/>
- 3) OMS: Organización Mundial de la Salud [Internet]. [Actualizado en abril 2016, consultado en marzo 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>
- 4) Wandosell, F. (2014). Mecanismos moleculares de la enfermedad de Alzheimer: Causas genéticas y “esporádicas”. En García Rodríguez, J.C. (Ed.). Neuroprotección en enfermedades Neuro y Heredo degenerativas. Barcelona, España: OmniaScience; **2014**. pp.33-52. Disponible en: <http://omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/article/viewFile/124/101>
- 5) Sampieri AI, Gómez-Hernández FA, Carmona-Aparicio L. Clasificación de los Biomarcadores en las Enfermedades del Sistema Nervioso Central. *Acta Pediatr Mex* **2013**; 34: 171-172.
- 6) Desco M, Vaquero JJ. Imagen Molecular. *Nuevas Tecnologías* **2008**; 68-76
- 7) Bolognesi ML, Gandini A, Prati F, Uliassi E. From Companion Diagnostics to Theranostics: A New Avenue for Alzheimer's Disease? *J. Med. Chem* **2016**; 59 (17): 7759-7770. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00151.
- 8) Staderini M, Martín MA, Bolognesi ML, Menéndez J.C. Imaging of β -amyloid Plaques by Near-Infrared Fluorescent Tracers: a New Frontier for Chemical Neuroscience. *Chem Soc Rev* **2015**; 44 (7): 1807-1819. DOI: 10.1039/c4cs00337c.

- 9) Hualong F, Mengchao C, Liu Z, Peiyu T, Kaixiang Z, Jiabei D et al. High Sensitive Near-Infrared Fluorophores for In Vivo Detection of Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *J. Med. Chem.* **2015**; 58 (7): 6972-6983. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b0086.
- 10) Hongjuan T, Kaiyan L, Wer W. Near-Infrared Fluorescent Probes for Imaging of Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease. *Acta Pharm. Sin. B.* **2015**; 5 (1), 25-33.
- 11) Hider RC, Roy S, Ma YM, Le Kong X, Preston J. The Potential Application of Iron Chelators for the Treatment of Neurodegenerative Diseases. *Metallomics* **2011**; 3 (3), 239-249. DOI:10.1039/c0mt00087f.
- 12) Hider RC, Ma Y, Molina-Holgado F, Gaeta A, Roy S. Iron Chelation as a Potential Therapy for Neurodegenerative Disease. *Biochem. Soc. Trans* **2008**; 36 (6), 1304-1308. DOI:10.1042/BST0361304.
- 13) Yang T, Yang L, Zhang C, Wang Y, Ma X, Wang K, Luo J, Yao C, Wang X, Wang X. Copper–Amyloid- β Targeted Fluorescent Chelator as a Potential Theranostic Agent for Alzheimer's Disease. *Inorg. Chem. Front* **2016**; 3 (12), 1572-1581. DOI: 10.1039/c6qi00268d.
- 14) Jadhao M, Das C, Rawat A, Kumar H, Joshi R, Maiti S, Kumar Ghosh S. Development of Multifunctional Heterocyclic Schiff Base as a Potential Metal Chelator: a Comprehensive Spectroscopic Approach Towards Drug Discovery. *J Biol Inorg Chem* **2017**; 22 (1), 47-59. DOI: 10.1007/s00775-016-1407-2.
- 15) Park K, Seo Y, Kim MK, Kim KD, Kim YK, Choo H, Chong Y. Curcumin-based Molecular Probe for Near-Infrared Fluorescent Imaging of Tau Fibrils in Alzheimer's Disease. *Org. Biomol. Chem.*, **2015**; 13 (46), 11194-11199. DOI: 10.1039/C5OB01847A.
- 16) Zhang X, Tian Y, Yuan P, Li Y, Yaseen MA, Grutzendler J, Moore A, Ran C. A Bifunctional Curcumin Analogue for Two-Photon Imaging and Inhibiting Crosslinking of Amyloid Beta in Alzheimer's Disease. *ChemComm* **2014**; 50 (78), 11550-11553. DOI: 10.1039/c4cc03731f.
- 17) Li Y, Xu D, Ho S-L, Li H-W, Yang R, Wong MS. A Theranostic Agent for in Vivo Near-Infrared Imaging of β -Amyloid Species and Inhibition of β -Amyloid Aggregation. *Biomaterials* **2016**; 94, 84-92. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.03.047.
- 18) Staderini M, Aulic S, Bartolini M, Ngoc Ai Tran H, González-Ruiz V, Pérez DI, Cabezas N, Martínez A, Martín MA, Andrisano V, Legname G, Menéndez JC, Bolognesi ML. A Fluorescent Styrylquinoline with Combined Therapeutic and Diagnostic Activities Against Alzheimer's and Prion Diseases. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**; 4 (2): 225-229. DOI: 10.1021/ml3003605.